93—95

维普资讯 http://www.cqvip.com

73200 (17)

动 物 学 研 究　1993, 14 (1): 93—95　ISSN 0254-5853
Zoological Research　CN 53-1040 / Q

家蚕卵半胱氨酸蛋白酶纯化及抗血清制备

PURIFICATION OF A CYSTEINE PROTEINASE FROM EGGS OF SILKMOTH (*Bombyx mori*) AND PREPARATION OF THE ANTISERUM

关键词: 家蚕、半胱氨酸蛋白酶, 纯化、抗血清

Key words: Silkmoth (*Bombyx mori*), Cysteine proteinase, Purification, Antiserum

罗提纯　赵小凡;

S881.24

据报道, 家蚕卵中存在半胱氨酸蛋白酶 (Cysteine proteinase, CP), 其性质与哺乳类溶酶体半胱氨酸蛋白酶类的组织蛋白酶 L 相似. 最佳作用 pH 为 3.5, 体外最适作用底物为牛血红蛋白, 体内最适作用底物为卵黄磷蛋白. 经 SDS-PAGE 分析, 分子量为 47KD. 其主要作用是在胚胎发育过程中降解卵黄蛋白质, 供胚胎发育之需要.

在成熟卵中具很高含量的半胱氨酸蛋白酶, 在胚胎发育开始前, 并不发生卵黄蛋白质的水解, 其作用机制尚待阐明. 为了进一步研究半胱氨酸蛋白酶的组织分布、合成位点、及 cDNA 克隆等, 作者从家蚕卵中纯化了半胱氨酸蛋白酶, 并制备了抗血清.

材料和方法　家蚕由实验室饲养. 牛血红蛋白购于日本 Worthington 公司, DEAE-Cellulose (DE-52) 购于日本 Whatman 公司, Sepharose CL-6B 购于 Pharmacia 公司, 羟基磷灰石由高桥进教授合成、其余试剂为分析纯.

剖腹取充分成熟的家蚕卵, 加入缓冲液 (10 mmol / L Tris-HCl, pH 7.0, 1mmol / L EDTA, 2mmol / L 巯基乙醇) 匀浆、离心 1 h (18000r / min)、取上清液加入饱和硫酸铵至 45%, 搅拌 15 min 后离心 (10000r / min 30min), 取沉淀物溶于少量缓冲液中, 经透析后加到 DEAE-纤维素柱上层析 [2.5 × 50 (cm)], 以含 0.5 mol / L NaCl 的缓冲液洗脱. 收集活性部分、透析、过羟基磷灰石柱 [1 × 1 (cm)]. 过滤液经超滤浓缩 (滤膜 Up-20) 加到 DEAE-Toyopearl 柱 [1 × 30 (cm)], 以 0.5 mol / L NaCl 缓冲液梯度洗脱. 收集半浓缩活性部分, 经 Sepharose CL-6B 柱 [4 × 100 (cm)] 层析, 再经 DEAE-Toyopearl 柱 [1 × 30 (cm)] 进一步纯化. 纯化产物经浓缩后加入 20% 甘油贮存于 −70℃.

以 SDS-PAGE 分析产物纯度, 方法参照 Laemmli (1970).

酶活性分析参照 Kageyama (1981) 方法进行. 反应液为 1 ml pH 3.5 牛血红蛋白 (2%), 样品 10—200μl, 37℃、1h、以 2ml 5% TCA 中止反应, 取滤过液测 280nm 吸光度. 活性抑制实验在上述反应液中增加了 N- [N-(1, 3-trans-carboxyran-2-carbonyl) -L-leucyl] -agmatine, E-64.

蛋白质含量测定采用 Lowry 法.

兔抗血清制备参照 Bailey (1984) 方法.

免疫沉淀电泳参照 SDS-PAGE 方法略加修改.

结果　1. 半胱氨酸蛋白酶纯化　从 100g 卵中经 6 步纯化过程、最终获得 1.4mg 纯化的半胱氨酸蛋白酶 (表 1). 层析结果见图 1.

对每一步纯化产物进行了 SDS-PAGE 分析, 最终产物为一条带. 分子量估计为 47kD (图 2). 酶活性可被 E-64 抑制.

本文 1992 年 1 月 6 日收到、同年 7 月 22 日修回.

维普资讯 http://www.cqvip.com

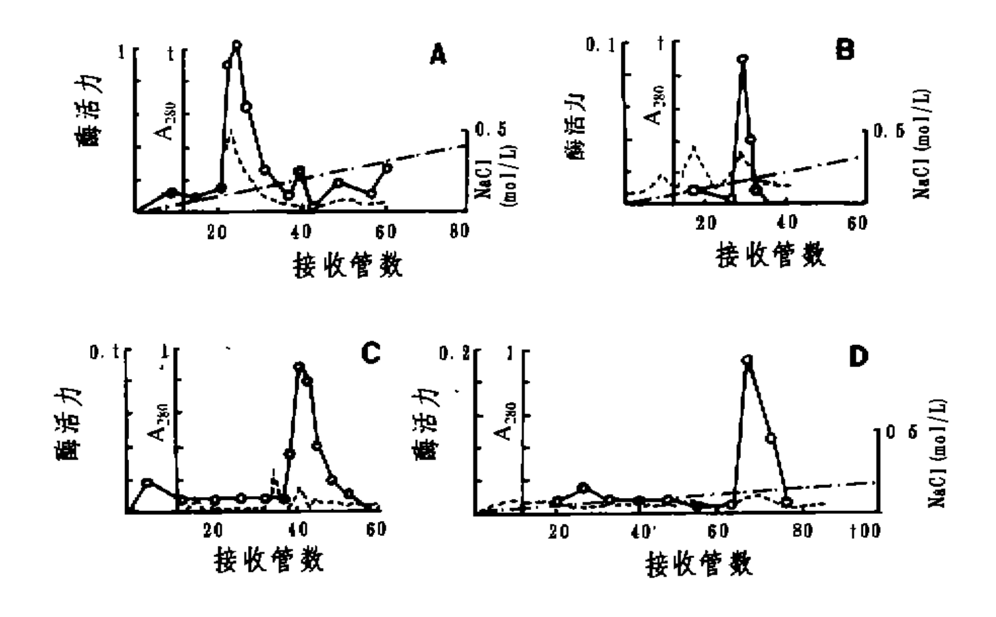


图1 系列层析（酶活力以 Units／ml 表示）

Fig.1 The results of sequencial chromotography

○———○ 酶活力 -----蛋白质吸光度 —·—·—· NaCl

A. DEAE-纤维素 B. 第1次 DEAE-Toyopearl C. 琼脂糖凝胶 D. 第2次 DEAE-Toyopearl

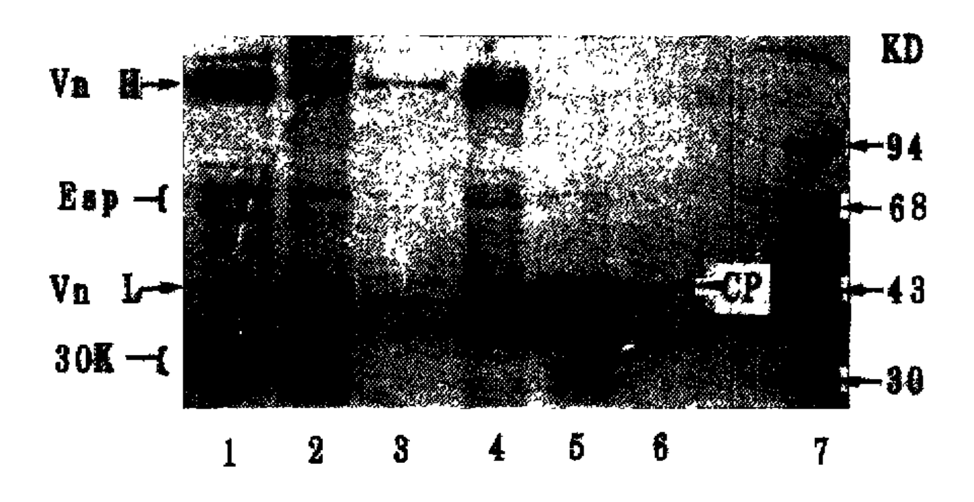


图2 每步纯化产物 SDS-PAGE

Fig.2 The SDS-PAGE of the results in every purification step

1. 45%硫酸铵 2. DEAE-纤维素 3. 羟基磷灰石 4. DEAE-Toyopearl 5. 琼脂糖凝胶 6. DEAE-Toyopearl 7.标准蛋白质：磷酸化酶 b94kD；牛血清蛋白 68kD；卵清蛋白 43kD；碳酸酐酶 30kD CP：半胱氨酸蛋白酶 Vn：卵黄磷蛋白 ESP：卵特异蛋白 30K：30K 蛋白

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1　家蚕卵半胱氨酸蛋白酶纯化

Tab.1　Purification of a cysteine proteinase from silkmoth eggs

步　骤	蛋白质总量 (mg)	活　力 (units)	比活	产率 (%)
匀浆液	18000	4836	0.027	100
45%硫酸铵沉淀	875	90	0.1	20
DEAE-纤维素	233	28.8	1.2	6
第 1 次 DEAE-Toyopearl	7.2	36	5	7
琼脂糖凝胶	2.7	10.4	3.8	2
第 2 次 DEAE-Toyopearl	1.4	4.2	2.9	0.8

2. 抗血清制备、滴度及免疫沉淀电泳　在皮下注射纯化的半胱氨酸蛋白酶后，第 3 周检测到抗原-抗体沉淀，在 2—16 倍稀释的兔抗血清中均可检测到半胱氨酸蛋白酶抗体（图 3）。

以抗血清与卵提取液反应后的免疫沉淀进行 SDS-PAGE，结果在大约 47kD 处出现半胱氨酸蛋白酶带（图 4）。

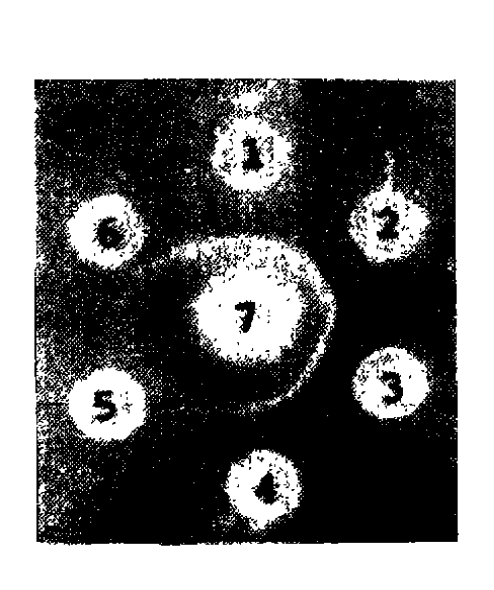


图 3　琼脂双向免疫扩散

Fig. 3　Ouchterlony double immunodiffusion

1-6 分别为稀释 2、4、8、16、32、64 倍的免抗血清　7 为家蚕卵提取液

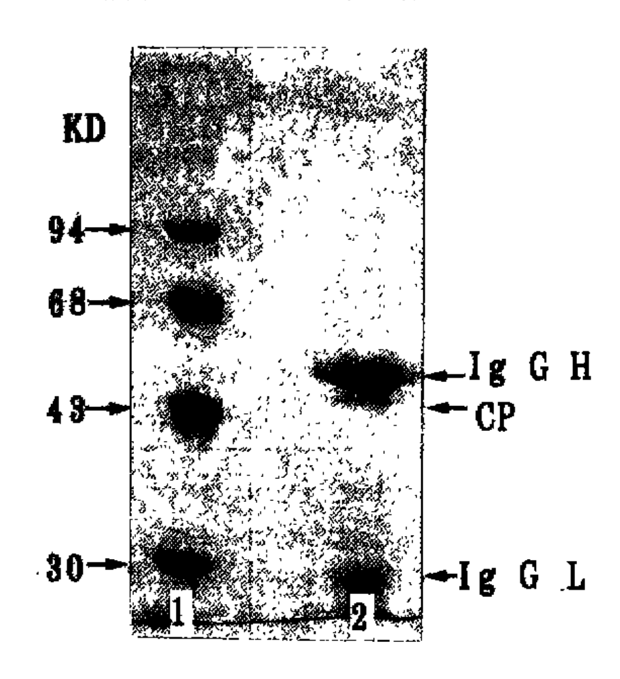


图 4　免疫沉淀 SDS-PAGE

Fig. 4　SDS-PAGE of immunoprecipitate

1. 标准蛋白质　2. 免疫沉淀

纯化产物的分子量在 SDS-PAGE 上约为 47kD，最适作用 pH 为 3.5，其活性可被半胱氨酸蛋白酶特异性抑制剂 E-64 所抑制。表明纯化产物为半胱氨酸蛋白酶。以此产物制备的抗血清对家蚕半胱氨酸蛋白酶具高度专一性。

赵小凡
Zhao Xiaofan
(山东大学生物系　济南　250100)
(Department of Biology, Shandong University, Jinan, 250100)
S. Y. Takahashi
(Department of Biology, Faculty of Liberal Arts, Yamaguchi University, 753, Yamaguchi, Japan)